

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Übersetzung der
europäischen Patentschrift

87 EP 0 544 450 B1

10 DE 692 21 826 T 2

51 Int. Cl.⁶:
B 01 J 20/32
B 01 J 47/00
B 01 J 39/16

DE 692 21 826 T 2

- 21 Deutsches Aktenzeichen: 692 21 826.2
86 Europäisches Aktenzeichen: 92 310 555.5
86 Europäischer Anmeldetag: 19. 11. 92
87 Erstveröffentlichung durch das EPA: 2. 6. 93
87 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 27. 8. 97
47 Veröffentlichungstag im Patentblatt: 2. 1. 98

30 Unionspriorität:

100105 20.11.91 IL

73 Patentinhaber:

Bar-Ilan University, Ramat Gan, IL

74 Vertreter:

Benedum, U., Dipl.-Chem.Univ.Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
81669 München

84 Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE

72 Erfinder:

Margel, Shlomo, Rehovot, IL

54 Aufgetragene Mikrokugeln

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 692 21 826 T 2

Die Erfindung betrifft eine chemische Zusammensetzung, bei der Mikrosphären kovalent an ein festes Trägermaterial gebunden sind, wobei die derart gebundenen Mikrosphären reaktionsfähige Restfunktionen enthält.

Aufgrund ihrer kugelförmigen Gestalt und ihrer großen Oberfläche gibt es für Mikrosphären zahlreiche Anwendungen wie spezifische Zellmarkierung, Zelltrennung, Phagozytose, Diagnose, Zellwachstum, Affinitätschromatographie und Hä-

10 moperfusion (s. bspw. Margel, S., Applied Biochemistry and Biotechnology, 1983, 2, 523; Lazar, A., Silverstein, L., Margel, S. und Mizrahi, M., Dev. in Biol. Stand., 1985, 60, 456; Pines, M. und Margel, S., J. of Immunoassay, 1986, 7, 97; Palzer, R., Walton, J. und Rembaum, A., In

15 Vitro, 1978, 14, 336; Rembaum, A., Yen, S.P.S. und Volkson, W., Chem. Tech., 1978, 8, 182). In letzter Zeit macht man beträchtlichen Fortschritt bei der Synthese von Mikrosphären mit schmaler Größenverteilung, damit die Qualität und die Brauchbarkeit von Polymermikrosphären besser werden.

20 Stark einheitliche Polymermikrosphären werden jetzt als Adsorptionsmittel für HPLC, Kalibrierungsstandards und Spacer für Flüssigkristalle wirksam angewendet [Ugelstad, J., Soderberg, L., Berge, A. und Bergstrom, J., Nature (London), 1983, 303, 5].

Die Wirksamkeit und die Verwendung polymerer Mikrosphären in Lösung, insbesondere von Mikrosphären mit einem kleineren Durchmesser als ca. 0,4 µm, sind aus einem praktischen Gesichtspunkt noch eingeschränkt, da es einige größere Nachteile gibt. Dies sind z.B. Schwierigkeiten bei

30 der Trennung freier Liganden von an die Mikrosphären gebundenen Liganden und die Instabilität der Mikrosphären in Lösung gegenüber Agglutination. Der letzte Nachteil ist der Hauptgrund für die Schwierigkeiten bei der Durchführung von Reaktionen mit Polymermikrosphären.

35 Kovalent an geeignete Antikörper oder Lectine gebundene Polymermikrosphären werden zur Kartierung von Zellrezeptoren verwendet. Für die spezifische Markierung von T-Lymphozyten verwendet man bspw. Polyaldehydmikrosphären

mit einer Größe von 0,1 μm bis 0,7 μm , die an anti-Thy-1,2-Antikörper gebunden sind. Ähnliche, kovalent an das Arzneimittel Dinatriumchromoglycat gebundene Mikrosphären werden für die spezifische Markierung basophiler Leukämiezellen aus Ratte verwendet (Pacht, I., Mazurek, N. und Margel, S., Drug Conjugates of Polymeric Microspheres as Tools in Cell Biology, Plenum Publishing Corporation, 1982, S. 109-123).

Polystyrolperlen, die mit Divinylbenzol von ungefähr 30 μm Durchmesser quervernetzt sind und auf der Oberfläche Sulfatgruppen (negative Ladung) enthalten, die elektrostatisch an quartäre Ammoniumgruppen enthaltende Polystyrolpartikel von 0,1-0,5 μm Durchmesser gebunden sind, (und die bei Dionex Corporation erhältlich sind), werden bei der Ionenchromatographie für die Ionentrennung verwendet (Small, H., Stevens, T.S. und Baumann, W.W., Anal. Chem., 1975, 47, 1801; Gjesde, D.T. und Fritz, J.S. in "Ion Chromatography", 2. Aufl. Hüthig, Heidelberg, 1987). Diese Ionenaustauscherharze vom Hybridtyp (Harzmembranen) haben eine geringe Kapazität. Die gebundenen Kolloidpartikel haben außerdem eine begrenzte Größe (bis etwa 0,5 μm) und können durch Kompetitionsreaktion von dem Perlenkern entfernt werden.

Einige Patente beschreiben die Adhäsion verschiedener Mikrosphärenarten, z.B. Glasmikrosphären, an einen geeigneten Träger. Dieser wird dabei mit den Mikrosphären in Gegenwart eines Verdickungsmittels und eines Klebemittels imprägniert. Die Mikrosphären werden so an den Träger gebunden. Das Bindemittel enthält gewöhnlich Epoxid-Verbindungen oder andere Klebemittel (Seuzaret, L., FR 2609835; Thomson, E. et al., EP 209337; Hicks, I.A. et al., US 4548863).

Die Patentliteratur beschreibt auch ein Verfahren zum Pfropfen von Polyacroleinmikrosphären mit 0,01 μm bis 0,2 μm Durchmesser auf die Oberfläche von organischen Polymeren, wie Polystyrol, durch ein Hochenergiebestrahlungsverfahren (Co-Bestrahlung) (Margel, S., IL 67619; Rembaum, A. et al., US 4534996). Ein entgastes Acrolein wird diesem

Verfahren zufolge in wäßriger Lösung in Gegenwart eines geeigneten Tensides und des organischen Trägers mit der Hochenergiequelle polymerisiert. Dieses Verfahren hat jedoch einige Nachteile: (a) es wird eine Hochenergiequelle benötigt; (b) der Mechanismus des Hochenergieverfahrens ist unklar, und das Verfahren ist nicht ausreichend (kontrollierbar); (c) die Struktur des erhaltenen Verbundmaterials ist nicht homogen und charakteristisch, und außerdem ist ein Teil der gepfropften Oberfläche kaum mit Mikrosphären beschichtet, wohingegen der andere Teil der Oberfläche mit einer oder mehr Mikrosphärenschichten heterogen beschichtet ist; (d) das Hochenergieverfahren für die kovalente Bindung von Polyacroleinmikrosphären an die Oberfläche von Polymeren ist auf anorganische Substrate, z.B. Glas, Halbleiterstoffe wie Silizium, und einige organische Polymere wie Polytetrafluorethylen nicht anwendbar; (e) das Hochenergieverfahren ist nicht anwendbar für die Bindung von zuvor hergestellten Mikrosphären an die Oberfläche fester Substrate.

20 Die Erfindung betrifft mikrosphärenhaltige chemische Zusammensetzungen, wobei die Nachteile der Produkte des Standes der Technik vermieden werden.

Die Erfindung stellt somit eine chemische Zusammensetzung bereit, umfassend ein festes Substrat, das kein Ionenaustauscherharz ist, wobei das Substrat kovalente Bindungen hat, die bereitgestellt werden, indem die nicht-polymeren Liganden an mindestens ein Mitglied, ausgewählt aus den Subgruppen (a) und (b) gebunden werden, nämlich (a) im wesentlichen eine einzigen Mikrosphärenschicht, die reaktive Restfunktionen hat; (b) zahlreiche Mikrosphärenschichten, wobei die aneinandergrenzenden Schichten der zahlreichen Schichten über kovalente Liganden kovalent aneinander gebunden sind und die innerste Schicht der zahlreichen Schichten über die vorstehend genannten kovalenten Bindungen an das feste Substrat gebunden ist, wobei zumindest die äußerste Schicht der zahlreichen Schichten reaktive Restfunktionen enthält; wobei die Mikrosphären entweder aus einer einzigen oder mehreren Mikrosphärenarten be-

stehen und einen Durchmesser von 0,03 bis 8 μm besitzen. Die vorstehend genannten kovalenten Bindungen können von einem als "A" bezeichneten Liganden bereitgestellt werden. Die aneinandergrenzenden Schichten der zahlreichen Schichten lassen sich über einen als "B" bezeichneten Zwischenliganden miteinander verbinden, wobei die Liganden (A) und (B) gleich oder verschieden voneinander sind.

Die in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen enthaltenen Mikrosphären sind vorzugsweise organische Polymermikrosphären. Ersatzweise sollen jedoch anorganische Mikrosphären im Schutzzumfang der Erfindung liegen, unabhängig davon, ob sie polymer sind oder nicht, wie Glas und Silica.

Offenbar kann zumindest eine Mikrosphärenart aus im wesentlichen einer einzigen Art oder statt dessen aus mehr als einer Art bestehen. Liegen außerdem bei den erfinderischen Zusammensetzungen zahlreiche Mikrosphärenschichten vor, können diese aus im wesentlichen der gleichen Mikrosphärenart bestehen oder verschiedene Mikrosphärenarten enthalten. Alle Schichten der zahlreichen Schichten können insbesondere im wesentlichen nur eine bestimmte Mikrosphärenart enthalten. Ersatzweise kann zumindest eine Schicht der zahlreichen Schichten mehr als eine Mikrosphärenart enthalten.

Die Erfindung stellt neue Strukturen bereit, bei denen Mikrosphären in Kombination mit einem festen Substrat und mit stärkeren Immobilitätseigenschaften für Fremdstoffe verwendet werden. Sie unterscheiden sich von Strukturen mit ähnlichen Oberflächen, die in vielen Dokumenten des Standes der Technik, z.B. den Folgenden, offenbart sind:-

EP 0385587 beschreibt eine Ionenaustauscherzusammensetzung, die synthetische Harzträgerpartikel, Dispergierungsmittel und feine, synthetische Harzschichtpartikel enthält. Das Dispergierungsmittel kann an die Trägerpartikel und/oder die Feinpartikel über kovalente Bindungen gebunden sein.

US 4111838 beschreibt ein Chromatographiematerial, das Polysaccharidpartikel einer Größe von etwa 25-300 μm

enthält, die kovalent an einen anorganischen Träger gebunden sind.

5 US 4252644 beschreibt ein Verfahren für die chromatographische Trennung von Ionen mittels einer Zusammensetzung aus einem Ionenaustauscherharz ("Komponente A") und einem fein verteilten Material ("Komponente B") mit Ionenaustauscherstellen, die freie Stellen der Komponente A anziehen. Dadurch bildet die Komponente B eine irreversibel gebundene Monoschicht auf Komponente A, d.h. sie ist gegenüber 0,5 M NaOH stabil.

10 EP 0071704 beschreibt Systeme mit großer Oberfläche und reaktiven Gruppen, die Substrate mit nukleophilen Gruppen binden können. Sie umfassen einen Polymerlatex (das Polymer mit den reaktiven Gruppen), der entweder selbst aggregiert oder an einen Träger gebunden ist, bspw. durch eine kovalente Bindung. Diese entsteht durch Umsetzung einer Oxirangruppe in dem Polymer mit einer OH-Gruppe aus Cellulose bspw. in einem Papier- oder Watteträger.

15 EP 0346037 beschreibt eine Ionenaustauscherzusammensetzung. Sie umfaßt Trägerpartikel ohne Ionenaustauscherkapazität und hydrophobe funktionelle Ionenaustauscherpartikel, die hydrophob, d.h. physikalisch, daran gebunden sind.

20 US 4070283 beschreibt ein Pulver aus Makropartikeln, umfassend einen undurchlässigen Makrokern, mindestens zwei an den Kern gebundene Mikropartikel-Monoschichten und mindestens zwei an die Oberfläche der Mikropartikel gebundene Ultramikropartikel. Die Schichten werden anscheinend zunächst elektrostatisch und anschließend durch Sintern bei einer hohen Temperatur gebunden.

25 EP 0357479 beschreibt ein granuläres Material, das durch Imprägnieren eines elektrisch geladenen granulären Substrates hergestellt wird. Dabei hat ein erstes hydrophiles Polymer die gleiche Anzahl an entgegengesetzten Ladungen (wodurch folglich eine elektrostatische Bindung entsteht). Der entstandene Verbundstoff ist dann irreversibel chemisch (d.h. kovalent) an ein zweites hydrophiles und bifunktionales Polymer gebunden.

Die Erfindung wird anhand der nachstehenden, beispielhaften, begleitenden Zeichnungen besser verstanden, und es wird gezeigt, wie sie verwirklicht werden kann. Es zeigt:

5 Figur 1. eine SEM-Aufnahme. Sie veranschaulicht eine Ausführungsform der Erfindung, in der Polyacroleinmikrosphären kovalent an Glasscheiben gebunden sind.

10 Figur 2 SEM-Mikrophotos. Sie veranschaulichen Ausführungsformen der Erfindung, bei denen Polyacroleinmikrosphären kovalent an einen Polyäthylen-(PE)-Film gebunden sind, nämlich: (a) eine unmodifizierte PE-Oberfläche, (b) eine $\text{PE}[\text{CO}_2\text{H}]$ -Oberfläche, (c) $\text{PE}[\text{CH}_2\text{OSi} < (\text{CH}_2)_n \text{NH}_2]$ -Oberfläche, (d) eine $\text{PE}[\text{CH}_2\text{OSi} < (\text{CH}_2)_n \text{NH}_2]$ -Oberfläche, die bereits an Polyacroleinmikrosphären gebunden sind.

15 Die Zusammensetzungen, die trägergebundene Mikrosphären beinhalten, haben viele potentielle Anwendungen, bspw. solche, die bereits vorstehend beschrieben werden und bei denen die Verwendung von Mikrosphären per se bekannt ist.

20 Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können lediglich zur Veranschaulichung z.B. auch zur Immobilisierung von Arzneimitteln, Prodrugs, Enzymen, Proteinen, Antikörpern und biologischen Zellen verwendet werden. Diese Materialien lassen sich selbstverständlich alle durch Erzeugung

25 chemischer Bindungen, z.B. kovalente, Ionen- und/oder koordinative Bindungen zwischen reaktiven Funktionen darin und den reaktiven Restfunktionen der trägergebundenen Mikrosphären immobilisieren. Diese Materialien können jedoch ersatzweise oder zusätzlich lediglich eine physikalische

30 Bindung mit den trägergebundenen Mikrosphärenzusammensetzungen haben. Sie können z.B. darauf adsorbiert und/oder darin eingeschlossen sein. Der Ausdruck "Immobilisierung" soll allgemein chemische und/oder physikalische Bindung bedeuten.

35 Die Mikrosphären selbst können aus bspw. Polyacrolein, Polyglutaraldehyd, Poly(chlormethyliertem) Styrol, Albumin oder Silica bestehen. Sie können je nach Bedarf eine breite oder enge Größenverteilung haben. Die Zusam-

mensetzungen oder die Mikrosphären, die sie beinhalten, können eine Reihe physikalischer Eigenschaften aufweisen, z.B. bezüglich Bioabbaubarkeit, Festigkeit oder Porosität. Die festen Substrate, an die die Mikrosphären kovalent gebunden sind, können wiederum aus einer Reihe von Materialien bestehen, bspw. organischen Polymeren (z.B. Polyalkenen wie Polyethylen), anorganischen Polymeren wie Gläsern, oder Halbleitermaterialien wie Silicium. Wird die Bindung zwischen den Mikrosphären und den festen Substraten und/oder die Bindung zwischen benachbarten Mikrosphärenschichten in einem Vielschichtensystem durch Liganden bereitgestellt, können diese bspw. omegafunktionelle Gruppen haben, wie Amino, Cyano, Trialkoxysilyl, Trihalosilyl, Formyl, Halogenalkyl, Hydroxyalkyl, Isocyanato, Carboxyl oder Derivate von Carboxyl wie Alkoxycarbonyl, Halogencarbonyl oder Hydrazidocarbonyl.

Es ist dem Fachmann ersichtlich, daß die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen in jeder geeigneten Weise hergestellt werden können. Ein Ligand kann bspw. mit einem Ende kovalent an ein festes Substrat und mit dem anderen Ende kovalent an Mikrosphären gebunden sein. Auf diese Weise lassen sich mehr als eine Mikrosphärenschicht zusammenfügen. Es kann für die anschließende chemische Reaktion mit einem geeigneten Liganden und/oder mit reaktiven Mikrosphären notwendig sein, chemische Aktivität auf die Oberfläche des Substratmaterials zu übertragen. Die beschriebenen Reaktionen können auch so durchgeführt werden, daß eine Mikrosphärenmonoschicht oder zumindest die äußere Schicht einer Mikrosphärenmultischicht reaktive Restgruppen behält. Der Fachmann erkennt auch, daß reaktive Restfunktionen (wie die oben beschriebenen) durch per se bekannte Verfahren in andere reaktive Funktionen umgewandelt werden können. Es folgt eine Beschreibung beispielhafter aber nicht einschränkender Ausgangsmaterialien.

Mikrosphären-Ausgangsmaterialien

Verschieden große monodispergierte Silicamikrosphären wurden von Merck, Darmstadt, Deutschland, erworben. Monodispergierte Polyacrylsäuremikrosphären wurden von Poly-
 5 sciences, Warrington, PA, USA, erworben. Polyglutaraldehydmikrosphären und Polyacroleinmikrosphären verschiedener Typen (nicht fluoreszierend, fluoreszierend und magnetisch) und Durchmesser wurden nach einem veröffentlichten Verfahren hergestellt (Margel, S., Meth. in Enzymol.,
 10 1985, 112, 164). Mikrosphären aus poly(chlormethyliertem) Styrol wurden nach einem veröffentlichten Verfahren hergestellt (Margel, S. Nev, E., und Fisher, I., J. Poly. Sci. Chem. Ed. 1991, 29, 347). Albuminmikrosphären wurden nach einem veröffentlichten Verfahren hergestellt (Longo, W.E.,
 15 Iwata, H., Lindheimer, T.A. und Goldberg, E.P., J. Pharm. Sci. 1982, 71(12), 1323; Kanzia, J., Scholz, W., Anderson, M.J. und Ruchholz, W.M., J. Immun. Meth. 1984, 75, 31.

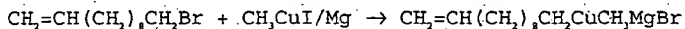
Oberflächenbehandlung von Substratmaterialien

20 Glassubstrate wurden entweder mit wäßriger (10%iger) NaOH-Lösung oder mit wäßriger HF-Lösung bei pH-Wert 3 gewaschen und anschließend ausgiebig mit Wasser und geeigneten organischen Lösungsmitteln (z.B. Chloroform und/oder Ethanol gewaschen). In den meisten Fällen wurden die Glas-
 25 substrate vor der Oberflächenmodifikation plasmabehandelt. Siliciumscheiben wurden mit geeigneten organischen Lösungsmitteln (z.B. Chloroform und/oder Ethanol) gewaschen und anschließend vor der Oberflächenmodifikation plasmabehandelt. Polyethylensubstrate sowie Cellulosesubstrate
 30 wurden jeweils mit geeigneten organischen Lösungsmitteln (z.B. Chloroform und/oder Ethanol) gewaschen und dann unter wasserfreien Bedingungen aufbewahrt.

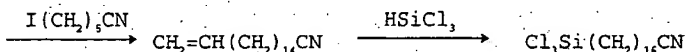
Reaktive Liganden

35 Folgende Substanzen wurden von ABCR, Karlsruhe, Deutschland, bezogen: $\text{Cl}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$, $(\text{MeO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$, $\text{Cl}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_9\text{CN}$, $(\text{MeO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_9\text{CN}$, $(\text{MeO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_9\text{NH}_2$, $\text{Cl}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_9\text{CO}_2\text{Me}$ und $(\text{MeO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_9\text{CO}_2\text{Me}$ und $p\text{-Cl}_3\text{SiC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{Cl}$.

$\text{Cl}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_n\text{CN}$ wurde wie folgt nach einem ähnlichen Verfahren synthetisiert wie von Balachander, N. und Suke-
nik, C.N., Tet. Let. 1988, 29, 55 beschrieben:



5



10

Die Synthese von $\text{Cl}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{Me}$ erfolgte auf ähnli-
che Weise unter Verwendung von $\text{I}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{Me}$ statt $\text{I}(\text{CH}_2)_n\text{CN}$.

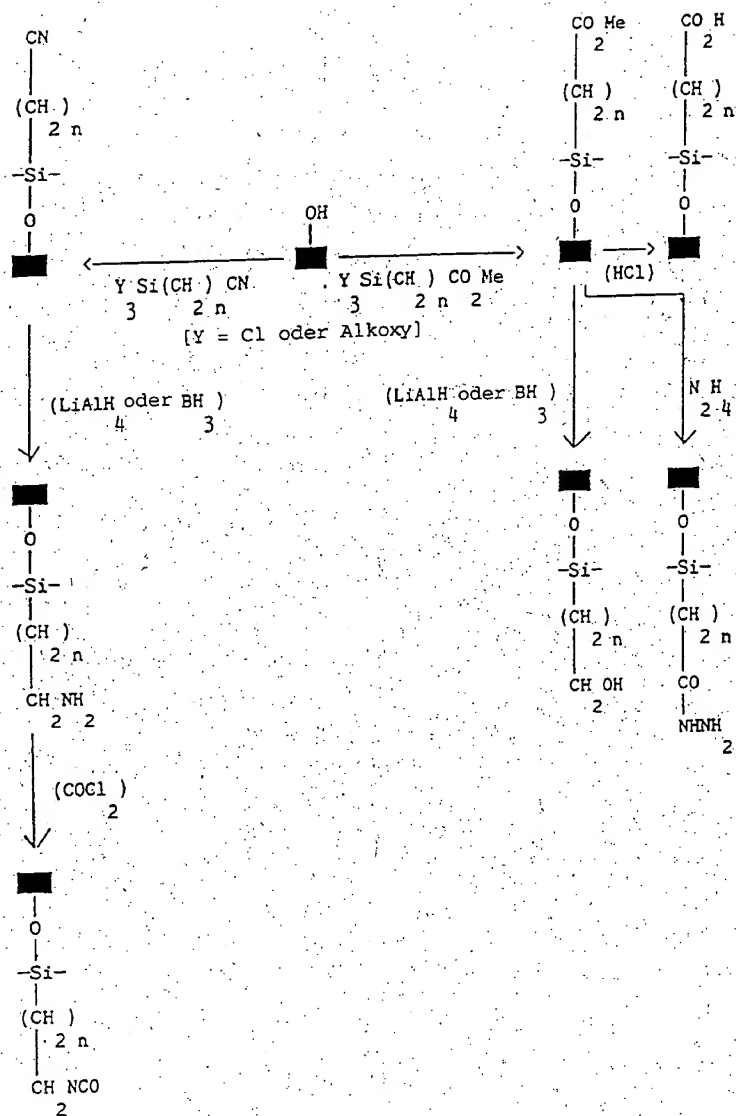
Oberflächenmodifikation der Substrate

Liganden vom Typ $p\text{-Cl}_3\text{SiC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{Cl}$, $\text{Cl}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_n\text{X}$ und/oder
(RO) $_3\text{Si}(\text{CH}_2)_n\text{X}$, wobei $n = 3$ bis 16 und $\text{X} = \text{CN}$, NH_2 oder
15 CO_2Me ist, wurden an die Oberfläche sauberer Substrate
(z.B. Glas, Silicium, Cellulose und Polyethylen mit OH-
Funktionalität auf seinen Oberflächen) kovalent gebunden,
indem diese Substrate mit einem organischen Lösungsmittel,
das den/die geeigneten Liganden enthielt, geschüttelt wurden.
20 Die Substrate wurden dann von dem Lösungsmittel ge-
trennt und mehrmals mit Ethanol und/oder Chloroform gewa-
schen. In einigen Fällen beinhaltete die Wäsche ebenfalls
eine Soxhlet-Behandlung während einiger Stunden. Die Li-
gandenkonzentration in den organischen Lösungsmitteln be-
25 trug gewöhnlich mehr als 0,01% (w/v) und in den meisten
Fällen mehr als 0,1% (w/v). Beispielhafte organische Lö-
sungsmittel waren Bicyclohexyl, Chloroform, Methylenchlo-
rid und Toluol. Es ließen sich natürlich andere Lösungs-
mittel verwenden. Die Umsetzung erfolgte meistens bei
30 Raumtemperatur. Es ließen sich jedoch ähnliche Ergebnisse
bei niedrigeren und höheren Temperaturen erhalten, z.B.
bis zum Siedepunkt des Lösungsmittels. Liganden vom Typ
(RO) $_3\text{Si}(\text{CH}_2)_n\text{X}$, wobei $n = 3$ ist, konnten auch an die vor-
hergehenden Substrate gebunden werden, indem das geeignete
35 Substrat mit dem Liganden in wäßr. Medium, z.B. mehrere
Stunden bei 90°C unter Verwendung von 0,1 M Natriumacetat,
pH-Wert 5,5, geschüttelt wurde. Das gebundene Substrat
wurde dann nacheinander mit Wasser, Ethanol und Chloroform

gewaschen (Wikstrom, P., Mandenius, C.F. und Larsson, P.O., J. of Chromatography 1988, 455, 105).

Das Schema 1 beschreibt einige Oberflächenmodifikationen, die an Substratoberflächen mit Hydroxylfunktionalitäten, z.B. Glas, Cellulose, Si und modifiziertem Polyethylen (PE) erfolgen. Gereinigte Oberflächen mit Hydroxylfunktionalitäten ließen sich mit Liganden wie $\text{Cl}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_n\text{X}$ oder $(\text{RO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_n\text{X}$, wobei X bspw. CO_2Me oder CN war, nach den vorhergehend beschriebenen Verfahren umsetzen. Dabei erhielt man Oberflächen mit Omega-Ester- oder -Cyano-Funktionalität. Die Estergruppen waren in freies Carboxyl umwandelbar, indem die Omega-Estergruppen-haltigen Substrate 1 Stunde bei Raumtemperatur in 0,1 N wäßriger HCl-Lösung getränkt wurden. Das Substrat wurde nach Entfernen aus der wäßrigen Lösung nacheinander ausgiebig mit Wasser, Aceton und Chloroform gewaschen. Die Estergruppen ließen sich in Hydrazidgruppen umwandeln, indem die Substrate mit den Omega-Estergruppen in konzentrierter Hydrazinhydratlösung 2 Stunden bei 50°C getränkt wurden. Das Substrat wurde nach Entfernen aus der wäßrigen Lösung nacheinander ausgiebig mit Wasser, Aceton und Chloroform gewaschen. Die Estergruppen waren in CH_2OH -Gruppen umwandelbar, indem die Omega-Estergruppen-haltigen Substrate in LiAlH_4 oder BF_3 in Tetrahydrofuran (THF) einige Stunden bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen, z.B. bis zu 50°C, getaucht werden. Das Substrat wurde nach Entfernen aus der THF-Lösung nacheinander ausgiebig mit Wasser, Aceton und Chloroform gewaschen.

Schema 1

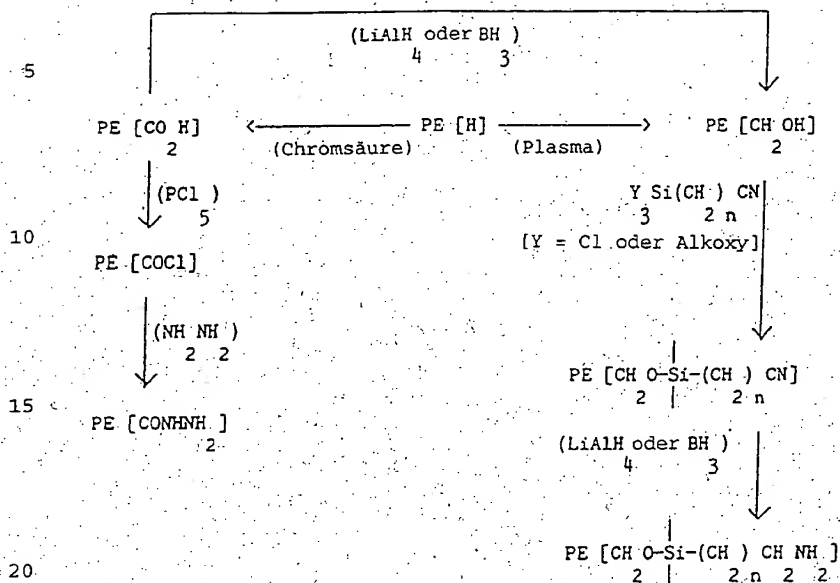


Die Cyanogruppen ließen sich in CH_2NH_2 -Gruppen umwandeln, indem die Omega-Cyanogruppen-haltigen Substrate wie zuvor beschrieben mit LiAlH_4 oder BF_3 reduziert wurden. Die Aminogruppen waren in Isocyanatgruppen umgewandelbar, indem die so gewonnenen Omega-Aminogruppen-haltigen Substrate in einer 20%igen Toluollösung von Phosgen einige Stunden bei Raumtemperatur getränkt wurden. Das Substrat wurde nach Entnahme aus der Toluollösung nacheinander ausgiebig mit Wasser, Aceton und Chloroform gewaschen.

Oberflächen mit Chlormethylgruppen wurden hergestellt, indem Oberflächen-Hydroxylgruppen mit Liganden wie $\text{Cl}_3\text{SiC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{Cl}$ nach den vorstehend beschriebenen Verfahren umgesetzt wurden. Die entstandenen Oberflächen-Chlormethylgruppen wurden nach einem veröffentlichten Verfahren in Aldehyde umgewandelt (Syper, L. und Meochowsky, J. Synthesis, 1984, 747).

Polyethylen- und Polypropylenoberflächen wurden nach einem veröffentlichten Verfahren wie in Schema 2 gezeigt oxidiert (Whitesides, G.M. und Ferguson, G.S., Chemtracts-Organic Chemistry, 1988, 1, 171). Diese Substrate wurden oxidiert, indem sie in einer Lösung aus $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}/\text{CrO}_3$ (Gewichtsverhältnis 29:42:29) 2 Minuten bei 70°C getaucht und anschließend mit Wasser und Aceton gewaschen wurden. Die Plasmabehandlung von Polyethylen oder Polypropylen ergab ersatzweise die Bildung von Oberflächen-Hydroxylfunktionalität.

Schema 2



25 Polyethylen und Polypropylen mit Oberflächenhalogen-carbonylgruppen (z.B. PE[COCl]), wurden gewonnen, indem das oxidierte Polymer, z.B. PE[CO₂H], in 10 ml wasserfreien Ether mit 1 g PCl₅ 1 Stunde bei Raumtemperatur getaucht wurde. Das PE[COCl] (bspw.) wurde dann aus der Etherlösung entnommen und ohne weitere Wäsche sofort für die nächste Modifikation der Substratoberfläche verwendet.

30 Polyethylen und Polypropylen, die Oberflächenhydrazidgruppen (z.B. PE[CONHNH₂]) enthielten, wurden gewonnen, indem das PE[COCl] (bspw.) in wasserfreier Dimethylformamidlösung mit 10% (w/v) Hydrazinhydrat eine Stunde bei Raumtemperatur getränkt wurde. Das Substrat wurde dann aus der DMF-Lösung entnommen und nacheinander ausgiebig mit Wasser, Aceton und Chloroform gewaschen.

35 Feste Substrate wie Polyethylen, Polypropylen, Glas und Si, die Oberflächenisocyanatfunktionalitäten (z.B.

PE[NCO]) enthielten, wurden enthalten, indem Substrate, die an der Oberfläche primäre-Amin- oder Hydrazidfunktionalitäten enthielten, in wasserfreier Toluollösung mit 20% Phosgen 1 Stunde bei Raumtemperatur getränkt wurden. Die Substrate wurden dann rasch entnommen und sofort für die kovalente Bindung der geeigneten Polymermikrosphären verwendet.

Empfindliche Oberflächen-Analyseverfahren z.B. ESCA, FTIR-ATR, Ellipsometrie und Berührungswinkel-Messungen [Balachander, N. und Sukenik, C.N., Tet. Let., 1988, 29, 55; Bain, C.D. und Whitesides, G.M., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1989, 28(4), 506] bewiesen die Bindung der Liganden an die Substrate und die Gegenwart der erwünschten Omega-funktionellen Gruppen, z.B. anhand eines Adsorptionspeaks im IR bei 1750 cm^{-1} für Estergruppen. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden gewöhnlich verwendet, um die Bindung der Mikrosphären an die modifizierten Substrate zu zeigen.

Die Erfindung wird anhand der nachstehenden nicht einschränkenden Beispiele weiter veranschaulicht.

BEISPIEL 1

Glasscheiben mit an der Oberfläche kovalent gebundenen Aminfunktionalitäten, die durch Umsetzung von $\text{Cl}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{CN}$ und/oder $(\text{MeO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{CN}$ mit Oberflächen-OH-Gruppen und anschließender Reduktion von CN in CH_2NH_2 hergestellt wurden, wurden 12 Stunden bei Raumtemperatur in einer wässrigen Lösung getränkt, die 1% (w/v) monodispergierte Polyacroleinmikrosphären mit einem mittlerem Durchmesser von $0,7\text{ }\mu\text{m}$ enthielt. Die Glasscheiben wurden dann aus der wässrigen Lösung entnommen und ausgiebig mit Wasser gewaschen. Rasterelektronenmikroskopie (SEM) zeigte, daß die Glasscheiben mit einer Polyacrolein-Mikrosphären-Monoschicht bedeckt waren (Fig. 1). Die Monoschicht war stabil und wurde auch durch mehrmaliges Waschen mit kaltem Wasser und/oder kochendem Chloroform oder durch längere Behandlung mit Chloroform in einer Soxhlet-Apparatur nicht beseitigt.

Wurde ein ähnliches Experiment mit Polyacroleinmikrosphären durchgeführt, die zur Reduktion der CHO-Gruppen in CH_2OH mit NaBH_4 vorbehandelt waren, waren weniger als 3% der Oberfläche der Glasscheiben mit Mikrosphären bedeckt.

5

BEISPIEL 2

Das Beispiel 1 wurde wiederholt, indem statt der 1%igen Mikrosphärenlösung 10⁻³%ige, 10⁻²%ige und 10%ige (w/v) Lösungen verwendet wurden. Die erhaltenen Prozentsätze waren jeweils <5%, >25% und >30%.

10

BEISPIEL 3

Das Beispiel 1 wurde wiederholt. Die gewaschenen Glasscheiben wurden anschließend 12 Stunden in einer wäßrigen Lösung getränkt, die 0,1% (w/v) fluoreszierende Polyacroleinmikrosphären (FITC-markiert) mit einem mittleren Durchmesser von 0,1 μm enthielt, aus dieser Lösung entnommen, und ausgiebig mit Wasser gewaschen. Die Glasscheiben fluoreszierten stark im Fluoreszenzmikroskop. Die SEM-Aufnahmen zeigten, daß die fluoreszierenden 0,1- μm -Mikrosphären an die Glasoberflächen in die Zwischenräume der zuvor gebundenen 0,7- μm -Mikrosphären gebunden waren.

15

20

BEISPIEL 4

Wurde Beispiel 1 mit $\text{Cl}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{CN}$ statt mit $\text{Cl}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{CN}$ wiederholt, verringerte sich die prozentuale Beschichtung um etwa 10%.

25

BEISPIEL 5

Wurde Beispiel 1 unter Verwendung von Mikrosphären mit einem mittleren Durchmesser von 0,03, 0,05, 0,4, 2,0 und 7,5 μm statt 0,7 μm wiederholt, wurden ähnliche Ergebnisse für die ersten drei Größen erhalten. Die prozentuale Beschichtung für die Mikrosphären mit 7,5 μm Durchmesser lag unter 20%, d.h. beträchtlich niedriger als in den anderen Fällen.

30

35

BEISPIEL 6

Wurde Beispiel 1 statt mit 0,7- μ m-Polyacroleinmikrosphären mit fluoreszierenden Mikrosphären (Rhodamin-markiert) und/oder magnetischen Mikrosphären mit einem mittleren Durchmesser von 0,2 μ m wiederholt, erhielt man ähnliche Ergebnisse.

BEISPIEL 7

Wurden die Beispiele 1-6 mit Si-Scheiben statt mit Glasscheiben wiederholt, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

BEISPIEL 8

Das Beispiel 1 wurde mit einem Polyethylenfilm statt mit Glasscheiben und Polyacroleinmikrosphären mit einem mittleren Durchmesser von 0,4 μ m (anstelle von 0,7 μ m) wiederholt. Die Fig. 2 zeigt SEM-Aufnahmen, die die allmählichen Änderungen auf der Polyethylenfilmoberfläche während des Verlaufs des Mikrosphären-Beschichtungsverfahrens zeigen.

BEISPIEL 9

Wurden die Beispiele 1-6 mit Polyethylen- und/oder Polypropylenfilm statt mit Glasscheiben wiederholt, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten, mit der Ausnahme, daß die prozentuale Beschichtung der Substratoberflächen durch die Mikrosphären in den meisten Fällen etwa 10% bis 30% niedriger war.

BEISPIEL 10

Wurden die Beispiele 1 und 5 mit Glasröhrchen einer Kapazität von 1ml, Glasflaschen einer Kapazität von 5 ml oder Glasfasern mit einem Durchmesser von etwa 1 mm statt mit Glasscheiben wiederholt, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

BEISPIEL 11

Wurde Beispiel 9 mit Polyethylenfasern mit 1 mm Durchmesser statt mit dem Film als Substrat wiederholt, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

5

BEISPIEL 12

Wurde Beispiel 1 mit Polyglutaraldehyd- statt mit Polyacroleinmikrosphären wiederholt, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

10

BEISPIEL 13

Wurde Beispiel 1 mit einer mikrosphärenhaltigen Ethanol-lösung statt mit der entsprechenden wäßrigen Lösung wiederholt, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

15

BEISPIEL 14

Wurde Beispiel 1 mit Polyacrylsäuremikrosphären statt mit Polyacroleinmikrosphären wiederholt, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

20

BEISPIEL 15

Wurde Beispiel 8 unter basischen Bedingungen bei pH-Wert 11,5 (in Gegenwart von Diisobutylethylamin) mit poly(chlormethyliertes Styrol-)Mikrosphären statt mit Polyacroleinmikrosphären wiederholt wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

25

BEISPIEL 16

Wurden die Beispiele 1, 5 und 15 mit Substraten wiederholt, die Oberflächenhydrazid- (statt Amin-) Funktionalitäten enthielten, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

30

BEISPIEL 17

Wurde Beispiel 15 mit einer CCl₄-Mikrosphärenlösung statt mit der wäßrigen Mikrosphärenlösung wiederholt, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten, ausgenommen, daß die ge-

35

bundenen Mikrosphären eher in Clustern statt einzeln auftraten.

BEISPIEL 18

5 Wurde Beispiel 1 mit Glasscheiben wiederholt, die Isocyanatfunktionalitäten statt Aminfunktionalitäten enthielten, und wurden zusätzlich die Polyacroleinmikrosphären in Wasser durch Silicamikrosphären mit einem mittleren Durchmesser von 0,25 μm in wasserfreiem Toluol ersetzt,
10 wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

BEISPIEL 19

 Wurde Beispiel 18 bei 50°C mit einem Polyethylenfilm, der Oberflächenhalogen-carbonylgruppen enthielt, statt mit
15 Glasscheiben, die Isocyanatgruppen enthielten, wiederholt, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

BEISPIEL 20

20 Das Beispiel 1 wurde mit Glasscheiben wiederholt, die Aldehydfunktionalitäten statt Aminfunktionalitäten enthielten. Zusätzlich wurden die Polyacroleinmikrosphären durch Albuminmikrosphären mit einem mittleren Durchmesser von 0,1 μm ersetzt. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, daß die Mikrosphären an das Glas banden. Wurde
25 ein ähnliches Experiment mit Glasscheiben wiederholt, die mit Aminfunktionalitäten und/oder gar nicht beschichtet waren, banden die Mikrosphären nicht sonderlich gut an die Glasscheiben.

BEISPIEL 21

30 Wurden die Beispiele 1 und 5 mit $(\text{MeO})_2\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2$, das in wäßriger Lösung auf Glasscheiben geschichtet worden war, statt mit $\text{Cl}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{CN}$ wiederholt, wurden ähnliche
35 Ergebnisse erhalten.

BEISPIEL 22

 Das Beispiel 21 wurde mit 0,05 und 0,4 μm großen Mikrosphären und mit Eliza-Titerplatten (Immunoplatte-

von Nunc, Dänemark) statt mit Glasscheiben wiederholt. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen sowie Fluoreszenzmarkierungen (hergestellt durch Umsetzen von Aminoacridin mit den trägergebundenen Mikrosphären) zeigten die Bindung der Mikrosphären an die Titerplatten.

Wurde ein ähnliches Experiment mit Titerplatten durchgeführt, die nicht mit $(\text{MeO})_2\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2$ beschichtet waren, banden die Mikrosphären nicht sonderlich gut an die Titerplatten.

BEISPIEL 23

Viele Mikrosphärenschichten ließen sich an ein festes Substrat binden, indem (z.B.) eine zweite Schicht aus zweiwertigen oder mehrwertigen Reaktanten an reaktive Stellen auf der Oberfläche der ersten Mikrosphärenschicht gebunden wurde, gefolgt von einer zweiten Mikrosphärenschicht, usw. Somit wurde eine zweite Polyacroleinmikrosphärenschicht angelegt, indem zuerst $\text{Cl}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{CN}$ mit der anfänglichen, an Glasscheiben gebundenen Polyacroleinmikrosphären-Monoschicht umgesetzt wurde. Diese wurde wie in Beispiel 1 gewonnen. Anschließend wurden die von dem Reaktanten stammenden freien CN-Gruppen zu CH_2NH_2 -Gruppen reduziert. Schließlich wurde eine zweite Schicht aus Polyacroleinmikrosphären mit einem mittleren Durchmesser von 2 μm wie in Beispiel 1 beschrieben gebunden.

BEISPIEL 24

Kationenaustauscherharze wurden hergestellt, indem die Aldehydgruppen der gebundenen Polyacroleinmikrosphären zu Carboxylgruppen oxidiert wurden. Die Oxidation erfolgte, indem Sauerstoff während 6 Stunden durch eine wäßrige 0,1 M NaOH-Lösung, die die substratgebundenen Polyacroleinmikrosphären enthielt, geleitet wurde.

BEISPIEL 25

Kationenaustauscherharze wurden ebenfalls durch kovalente Bindung von 1-Aminopropansulfonsäure (1-APSA) an die substratgebundenen Polyacrolein- und/oder po-

ly(chlormethyliertes Styrol)-Mikrosphären erhalten. Dies erfolgte durch Tränken der substratgebundenen Mikrosphären während 12 Stunden bei Raumtemperatur in wäßriger Lösung bei pH-Wert 11, die 100 mg 1-APSA enthielt. Die so modifizierten substratgebundenen Mikrosphären wurden dann entnommen und ausgiebig mit Wasser und danach mit Aceton gewaschen. Anionenaustauscherharze wurden auf ähnliche Weise erhalten, indem N,N-Diethylaminoethylamin (DEAE) statt 1-APSA verwendet wurde.

BEISPIEL 26

In diesem Beispiel wurde ein radiomarkiertes Protein an die Oberfläche von Polyacrolein- oder Polyglutaraldehydmikrosphären mit einem Durchmesser von etwa 0,3 μm immobilisiert, die an einen Glasscheibenträger gebunden waren. Diese waren wie in den Beispielen 1, 12 bzw. 16 hergestellt. Dies erfolgte durch 24stündiges Schütteln dieser trägergebundenen Mikrosphären bei Raumtemperatur mit einer Salzlösung (0,5 ml), die ^{125}I -Bungarotoxin (64 μg) enthielt, und anschließendes wiederholtes Waschen (Dekantieren) mit Salzlösung, wobei ungebundenes ^{125}I -Bungarotoxin entfernt wurde. Ein Γ -Zähler zeigte, daß etwa 1300 Picomol/ cm^2 Protein an alle Mikrosphärenträgersysteme gebunden wurde.

Bei einem Kontrollexperiment, bei dem das System der trägergebundenen Mikrosphären zuerst mit NaBH_4 vorbehandelt wurde (um die Aldehydgruppen zu reduzieren), wurden nur etwa 5 Picomol/ cm^2 ^{125}I -Bungarotoxin an jedes System der trägergebundenen Mikrosphären gebunden.

BEISPIEL 27

Wurde Beispiel 26 wiederholt, jedoch mit Protein A statt mit Bungarotoxin, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Das Produkt ließ sich dann zur Entfernung von Immunglobulinspuren verwenden.

BEISPIEL 28

Poly(chlormethyliertes Styrol)-Mikrosphären, die an einen Polyethylenfilm gebunden waren und nach Beispiel 15 hergestellt worden waren, wurden 24 Stunden bei 50°C mit einer wäßrigen 0,1%igen (w/v) Deferoxaminlösung bei pH-Wert 11,5 geschüttelt. Ungebundenes Deferoxamin wurde durch wiederholtes Waschen mit Wasser (Dekantieren) entfernt. Das immobilisierte Deferoxaminprodukt konnte für die Entfernung von FeCl₃-Spuren aus wäßrigen Lösungen verwendet werden.

BEISPIEL 29

Substratgebundene Mikrosphären, hergestellt nach den Beispielen 1 und 15, wurden mehrere Stunden bei Raumtemperatur in einer wäßrigen Lösung getränkt, die 0,1% Phenolrot enthielt. Das farbige Produkt wurde mehrmals mit Benzol gewaschen und dann luftgetrocknet. Das Phenolrot diffundierte beim Einbringen in Wasser langsam hinaus, so daß die Intensität der roten Farbe in Wasser allmählich zunahm. Dies zeigt, daß man solche Produkte für kontrollierte Freisetzungszwecke verwenden kann.

BEISPIEL 30

Substratgebundene Mikrosphären, hergestellt nach Beispiel 1, wurden auf ähnliche Weise wie bei dem Verfahren von Beispiel 26 bei pH-Wert 7,0 mit Gelatine behandelt. Das Produkt wurde 1 Stunde mit einer physiologischen Lösung (PBS) geschüttelt, die 1% fixierte menschliche rote Blutzellen enthielt, und dann mehrmals mit PBS gewaschen. Die gebundenen roten Blutzellen erschienen deutlich unter dem Mikroskop. Dies zeigt die mögliche Verwendung der erfindungsgemäßen trägergebundenen Mikrosphären für die Zellimmobilisierung und somit für das Zellwachstum.

BEISPIEL 31

Die Löcher von mit Polyacroleinmikrosphären mit einem mittleren Durchmesser von 800 Ångström beschichteten Eliza-Titerplatten wurden etwa 15 Minuten bei Raumtemperatur

mit 0,1 ml PBS-Lösung inkubiert, die 0,1 µg Schaf-
Immunglobuline (SIgG) enthielt. Die Elizaplaten wurden
dann gründlich mit PBS gewaschen. Die restlichen Aldehyde
und Amine wurden blockiert, indem die an die Platte/
5 Mikrospären gebundenen SIgG mit 1% Rinderserumalbumin
und 1% Ethanolamin in wäßriger Lösung inkubiert wurden.
Biotinylierte Antikörper gegen die SIgG wurden durch ein
gewöhnliches Eliza-Verfahren bestimmt, bei dem die gebun-
denen SIgG mit seriellen Verdünnungen der biotinylierten
10 Antikörper gegen SIgG wechselwirkten. Danach erfolgte die
Umsetzung der SIgG-gebundenen Antikörper mit Extravidin-
peroxidase. Die Nachweisgrenze dieses Systems betrug etwa
1 ng.

15 Wurden gleiche Experimente mit nichtbeschichteten
Elizatiterplatten und/oder mit Elizatiterplatten durchge-
führt, die mit Aminen statt mit Mikrospären beschichtet
waren, sank die Nachweisgrenze erheblich.

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Stoffzusammensetzung, umfassend ein festes Substrat, das
5 kein Ionenaustauscherharz ist, das aber kovalente Bindungen
besitzt, bereitgestellt durch Verknüpfen von nicht-poly-
meren Liganden mit mindestens einem Glied, das ausgewählt
ist aus den Untergruppen (a) und (b), das heißt, aus
10 (a) einer im wesentlichen einzelnen Schicht von Mikro-
sphären, die verbliebene reaktive Funktionen aufweisen,
(b) einer Anzahl Mikrosphärenschichten, wobei
aneinander liegende Schichten der Anzahl Schichten durch
kovalente Liganden miteinander kovalent verknüpft sind
15 und die am meisten innenliegende Schicht der Anzahl
Schichten kovalente Bindungen zum damit verknüpften festen
Substrat hat, während die äußerste Schicht der Anzahl
Schichten verbliebene reaktive Funktionen aufweist;
wobei die Mikrosphären entweder von einem einzigen
20 Typ oder von mehr als einem Mikrosphärentyp sind und einen
Durchmesser von 0,03 bis 8 μm haben.
2. Stoffzusammensetzung nach Anspruch 1, wobei zumindest
eine der folgenden Bedingungen (i), (ii) und (iii)
zutrifft, nämlich: (i) die Mikrosphären sind Polymer-
25 Mikrosphären; (ii) zumindest einige der verbliebenen
reaktiven Funktionen wurden mit an sich bekannten Verfahren
in andere reaktive Funktionen umgewandelt; und (iii)
zumindest einige der verbliebenen reaktiven Funktionen
wurden verwendet, um mindestens einen Vertreter zu
30 immobilisieren aus der Gruppe mit Arzneien, Arznei-
Vorstufen, Proteine und biologische Zellen.
3. Stoffzusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die
kovalenten Liganden, die die kovalenten Bindungen des
35 Substrates bereitstellen, und die kovalenten Liganden,

die die kovalenten Verknüpfungen innerhalb der Anzahl Schichten bereitstellen, gleich sind oder zueinander verschieden.

- 5 4. Stoffzusammensetzung nach Anspruch 3, wobei die kovalenten Bindungen bereitgestellt werden von einem Verknüpfungsliganden (A) und die Anzahl Schichten kovalent miteinander verknüpft sind durch einen Verknüpfungsliganden (B), wobei die Liganden (A) und (B) gleich sind oder zueinander
10 verschieden.
5. Stoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei zumindest ein Typ aus im wesentlichen einem einzelnen Typ besteht.
- 15 6. Stoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei zumindest ein Typ aus mehr als einem Typ besteht.
7. Stoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Schichten im wesentlichen aus dem gleichen
20 Mikrosphärentyp bestehen.
8. Stoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Schichten verschiedene Mikrosphärentypen
25 enthalten.
9. Stoffzusammensetzung nach Anspruch 8, wobei jede Mikrosphärensicht im wesentlichen nur einen bestimmten Mikrosphärentyp enthält.
- 30 10. Stoffzusammensetzung nach Anspruch 8, wobei zumindest eine Schicht der Anzahl Schichten mehr als einen Mikrosphärentyp aufweist.

1/2

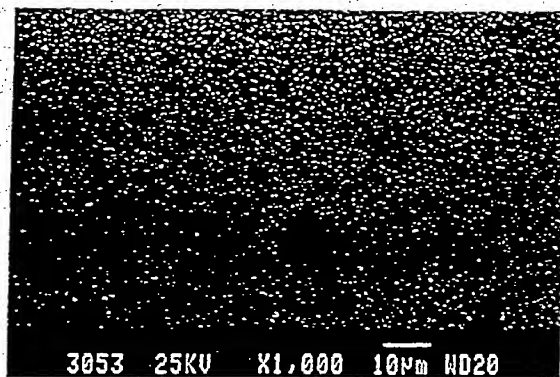


Fig. 1

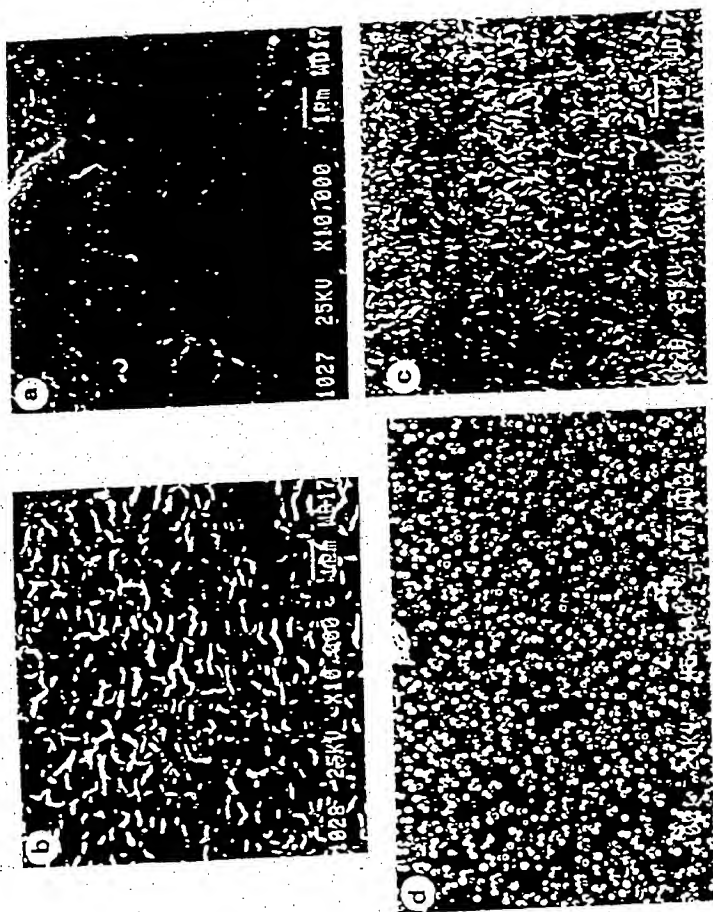


Fig. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)